

3. 牛由来マイコプラズマの薬剤感受性

橋本和典・木嶋真人

(家畜衛試 北海道支場)

最近、内外において集団飼育子牛の肺炎、乳房炎、関節炎、あるいは繁殖障害、伝染性角結膜炎の症例から種々のマイコプラズマの分離が報告されている。従来、牛由来のマイコプラズマの薬剤感受性を調べた報告は少なく、Socciら、Hamdyら、Ogataら、永友らの報告があるが、永友らの報告を除いては供試株は1～数株にすぎない。さらにUreaplasmaについては、わずかにBraunらの人由来株、永友らの牛由来株の報告をみるにすぎない。

演者らは子牛のマイコプラズマ性肺炎の予防、治療に効果的な薬剤を選択する目的で、肺炎病巣および鼻汁、また雌牛生殖器、流産胎児、精液、尿道および眼から分離したMycoplasma, AcholeplasmaおよびUreaplasmaについて、種

々の抗菌性薬剤に対する感受性を調べた。

供試菌株：参照株を除き、演者らにより島根、岡山、兵庫、京都、静岡、栃木および北海道の牛から分離、同定された*M. bovirhinis* 69株、*M. bovis genitalium* 33株、*A. laidlawii* 49株、*A. modicum* 4株およびUreaplasma sp. 66株である。表1のように呼吸器由来株の大部分は*M. bovirhinis* および*M. bovis genitalium*で、生殖器由来株の多くは*A. laidlawii*である。またUreaplasma sp. は各2株の尿道およびpink eye由来を除き、すべて子牛の呼吸器症状由来株である。

供試薬剤：Tetracycline系、Macrolide系、Chloramphenicol系、Aminoglycosid系、その他の抗生物質とNitrofran系の抗菌性

表1. 供試株の由来

Species	呼吸器系				泌尿生殖器系				眼 ^{*3}	その他 ^{*4}	計
	鼻汁 ^{*1}	気管 ^{*2}	肺 ^{*2}	肺門 ^{*2} リンパ	卵管 子宮	流産 胎児	精液	尿道 (雄)			
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	30	23	14	1						1	69
<i>M. bovis genitalium</i>	1		29					1		2	33
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	8				19	7	13			2	49
<i>A. modicum</i>	1				1		2				4
Total			107			43				5	155
Ureaplasma sp.	46	1	15					2	2		66

*1 水様～膿様鼻汁

*2 肺炎による淘汰・死亡子牛

*3 伝染性角結膜炎症例

*4 参照株

薬剤で、表2のように、いわゆる large-Myco-plasma には13剤、Ureaplasma には18剤を供試した。

感受性の測定：large-Myco. については家畜耐性菌研究会標準法に準拠した寒天平板希釈法により、各薬剤の最小発育阻止濃度を求めた。

表 2. 供 試 薬 剤

略名	供 試 薬 剤	Large-Myco.	Ureapl
CTC	クロルテトラサイクリン (武 田)		○
DOTC	ドキシサイクリン (台 糖)		○
OTC	オキシテトラサイクリン (台 糖)		○
TC	テトラサイクリン (武 田)	○	○
EM	エリスロマイシン (アボット)	○	○
KT	キタサマイシン (田 辺)	○	○
ML	マリドマイシン (武 田)		○
OL	オレアンドマイシン (台 糖)		○
SP	スピラマイシン (協和醸酵)	○	○
TS	タイロシン (武 田)	○	○
T-2636C	(マクロライド系) (武 田)		○
CP	クロラムフェニコール (三 共)	○	○
TP	チオフェニコール (エーザイ)		○
FM	フラジオマイシン (日本化薬)	○	
KM	カナマイシン (明 治)	○	○
MTM	マイトマイシンC (協和醸酵)	○	○
TM	チアムリン (三 共)		○
FMZ	フラミゾール (上 野)	○	○
FZ	フラゾリドン (上 野)	○	○
NF	ニトロフラントイン (上 野)	○	
NS	ニフルステレン酸ナトリウム (上 野)	○	
		13	18

PC-freeの変法Edward培地を用い、接種菌量は $10^4 \sim 10^5$ CFU/loop とし、ムチブル・インキュレーターでスポットした。接種した平板寒天は 37°C で2日間、 $10\% \text{CO}_2$ 下で培養し、マイコプラズマの発育を完全に阻止する薬剤の最高希釈濃度をもって、MIC (最小発育阻止濃度) とした。

Staph. aureus "209P" および *E. coli* "N IHJ" を対照株として毎回用いた。

ウレアプラズマについてはマイクロタイター法による液体培地希釈法を用い、尿素代謝を指標として各薬剤のMICを求めた。接種菌量は予備実験の結果から $10^3 \sim 10^4$ CCU/0.05 mlとし、菌量を一定に維持するため、供試株の液体培地培養菌をtirationしてmlあたりのCCUを求めると共に、demethyl sulfoxideを10%に加えて供試直前まで -80°C に保存した。各薬剤はU型トレイ上で、PC-freeのTaylor-Robinson

培地で希釈し、その希釈系列0.05 mlに、供試株の菌液を0.05 ml、さらに培地を0.05 ml加えてシールし、37℃で培養した。

判定は、まず薬剤を含まない対照培地での接種菌の発育による色調の変化を確認した時点で、各薬剤の最小発育阻止濃度を求めてこれをinitial MICとし、さらに培養を続け、各希釈系列での最終的な発育の「ノビ」を確認してfinal MICとした。

large-Myc. の薬剤感受性：表3に供試した*M. bovirhinis*, *M. bovigenitalium* および *A. laidlawii*に対する13薬剤のMICの範囲を示した。また表4は表の下方に示した基準で、+あ

るは一で各薬剤に対する感受性の評価を示した。*A. modicum* は供試株数がわずか4株で、しかも *A. laidlawii* とほぼ近似した成績であったので、表から省略した。

3菌種ともFMZとMTMには、きわめて感受性が高く、FMZのMICの分布は0.0008～0.20 μg/ml、MTMでは0.006～0.10 μg/mlであった。これにつぐのはTSで、さらにSP、KT、TCおよびCPが、そしてFMZ以外のフラン系の3剤が続いている。アミノ配糖体系のKMおよびFMの発育抑制効果は、供試薬剤の中では最も低かった。

Macrolide系のうち、EMは、*A. laidlawii*,

表3. 供試菌株に対する薬剤のMICの範囲

	<i>M. bovirhinis</i> (69株)	<i>M. bovigenitalium</i> (33株)	<i>A. laidlawii</i> (49株)
CP	1.56 ~ 6.25	0.78 ~ 6.25	≤0.025 ~ 100.0
FM	2.50 ~ 100.0<	5.00 ~ 100.0<	6.25 ~ 100.0<
KM	0.78 ~ 5.00	12.5 ~ 100.0	0.10 ~ 100.0<
TC	0.39 ~ 6.25	0.10 ~ 3.13	≤0.025 ~ 5.00
EM	2.50 ~ 100.0<	12.5 ~ 100.0<	≤0.025 ~ 100.0<
LM	0.78 ~ 6.25	0.39 ~ 3.13	≤0.025 ~ 100.0<
SP	0.20 ~ 3.13	0.39 ~ 3.13	0.10 ~ 100.0<
TS	0.05 ~ 3.13	≤0.025 ~ 0.39	≤0.025 ~ 100.0<
MTM	0.013 ~ 0.10	0.013 ~ 0.10	0.006 ~ 0.10
FMZ	0.0016 ~ 0.025	≤0.0008 ~ 0.05	0.003 ~ 0.20
FZ	0.20 ~ 3.13	0.025 ~ 12.5	0.39 ~ 100.0<
NF	0.78 ~ 6.25	1.56 ~ 12.5	1.56 ~ 100.0<
NS	0.05 ~ 12.5	0.025 ~ 3.13	0.20 ~ 12.5

μg/ml

表4 牛由来 large-Mycoplasma の薬剤感受性

種 薬剤	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. bovigenitalium</i>	<i>A. laidlawii</i>
CP	+(+~#)	+(+ #)	+(-~#)
FM	-(-~+)	-(-~±)	+(-~+)
KM	+(±~#)	±(-~+)	+(-~#)
TC	+(+~#)	#+(+~#)	#+(±~#)
EM	-(-~+)	-(-~+)	#+(-~#)
LM	+(+~#)	#+(+~#)	+(+~#)
SP	#+(+~#)	#+(+~#)	#+(-~#)
TS	#+(+~#)	#+(+~#)	#+(-~#)
MTM	#+(+~#)	#+(+~#)	#+(+~#)
FMZ	#+(+~#)	#+(+~#)	#+(+~#)
FZ	#+(+~#)	#+(+~#)	#+(+~#)
NF	#+(+~#)	#+(+~#)	#+(+~#)
NS	#+(+~#)	#+(+~#)	#+(+~#)

#: <0.1, #: 0.1~1.56, +: 3.13~2.50, ±: 5.00, -: 10.00 ≤

μg/ml

A. modicum に対しては、一部の耐性菌を除けば、 $0.39 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で発育を抑制したが、*M. bovirhinis*, *M. bovis genitalium* にはほとんど抑制効果はみられず、EMのマイコプラズマに対する発育抑制効果は菌種によって区々であった。この傾向は、TC, KMおよびFMにおいても多少認められた。

今回の実験においても、同一菌種間で供試株の分離地域、分離部位による感受性の差は認められなかったが、島根の子牛鼻汁由来株のうち、*A. laidlawii* 6株および*A. modicum* 1株、計7株はすべてのMacrolide系の薬剤に耐性があった。

ウレアプラズマの薬剤感受性：表5に66株のUreaplasma sp. に対する18薬剤のMICの分布と平均値を示した。供試株に対してはFMZおよびTMの抑制効果は著しく高く、TC系ではDOTCが最高で、ついでTC, CTC, OTCの順であった。Macrolide系のなかではEMの抑制効果が最高で、ML, KT, TS, T-2636Cがこれにつき、OLおよびSPの抑制効果はやや低かった。MTMの抑制効果はlarge-Myco. の場合よりも低かった。CP系の抑制効果はあまり強くなく、またKMは供試薬剤のなかでは最も弱かった。

initialとfinalのMICの平均値を比較

表5. 牛由来Ureaplasma sp. 66株の抗菌性薬剤に対するMICの平均値(GM)

Drugs*	Initial MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			Final MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Geometric mean	Mean-S.E.	Mean+S.E.	Geometric mean	Mean-S.E.	Mean+S.E.
CTC	0.0308	0.0277	0.0342	1.046	0.938	1.166
DOTC	0.0184	0.0168	0.0202	0.262	0.233	0.294
OTC	0.110	0.102	0.116	0.872	0.807	0.942
TC	0.0642	0.0591	0.0698	0.524	0.473	0.581
EM	0.0132	0.0112	0.0696	0.0641	0.0582	0.0701
KT	0.0478	0.0446	0.0512	0.306	0.260	0.360
ML	0.0298	0.0276	0.0323	0.130	0.115	0.147
OL	0.130	0.122	0.137	1.209	1.116	1.309
SP	0.422	0.390	0.456	2.875	2.623	3.152
TS	0.0757	0.0705	0.0812	0.399	0.359	0.444
T-2636C	0.0505	0.0477	0.0533	0.471	0.418	0.531
CP	0.301	0.279	0.324	6.252	4.188	9.333
TP	1.105	0.945	1.293	6.252	5.530	7.068
FMZ	0.00423	0.00373	0.00480	0.0279	0.0246	0.0137
FZ	0.204	0.173	0.241	1.896	1.635	2.200
KM	5.137	4.754	5.550	29.526	26.068	33.443
MTM	0.0260	0.0237	0.0286	0.158	0.145	0.173
TM	0.00503	0.00464	0.00545	0.0523	0.0464	0.0590

* Refer to materials and methods
S.E.=Standard error

すると、多くの薬剤で4~8倍、CTCでは約34倍もの差がみられた。そこで表6のように、8種の薬剤を選び、2株の *Ureaplasma sp.* を用いて37℃感作下での抗菌力の安定性を検討した。感作時の抗菌力を1としてそれぞれのMICを比較すると、TC、KT、SP、TS、FMZおよびMTMは48時間の感作でも比較的安定であったが、CTCの抗菌力は24時間以降、低下が著しかった。

これらの結果は、initial MICは薬剤の添加による供試菌の発育のおくれ、見掛け上の静菌作用を示しているにすぎず、供試菌の代謝を発育標識とする液体培地希釈法によるMICの表現は

final MICが妥当であると云えるが、CTCなどではその抗菌力の安定性に関して多少問題があるかも知れない。

以上の結果をまとめたのが表6で、発病子牛の呼吸器系、成牛の泌尿生殖器系から分離した *Acholeplasma sp.* *Mycoplasma sp.* は *in vitro* においてFMZおよびMTMに極めて感受性が高く、TS、SP、TC、FZにも比較的感受性が高かった。*Ureaplasma sp.* はFMZ、TMおよびEMに極めて感受性が高く、またTC系、SPを除くMacrolide系にも比較的感受性が高かった。

表6. 牛由来マイコプラズマの薬剤感受性

	‡	†	±~—
<i>A. laidlawii</i>	FMZ, MTM	TS, SP, EM, TC	FM
<i>M. bovirhinis</i>	FMZ, MTM	TS, SP, FZ	EM, FM
<i>M. bovigenitalium</i>	FMZ, MTM	TS, SP, LM, TC, FZ	EM, FM
<i>Ureaplasma sp.</i>	FMZ, TM, EM	TC系 SPを除くMacrolide系, MTM, FZ	KM

‡ : < 0.1 $\mu\text{g/ml}$, † : 0.1 ~ 1.56 $\mu\text{g/ml}$,

±~— : > 50.0 $\mu\text{g/ml}$,

今後、マイコプラズマの薬剤感受性測定に際しては、供試菌種の培養温度、時間と薬剤の安定性、発育抑制濃度と静菌あるいは殺菌濃度との関連を検討し、その手技の標準化が必要と思われる。

(本報告の詳細については、Kishima et al.

(1978), *Nat. Inst. Anim. Health. Q. (Jpn)*, 18, 18~26, および Kishima & Hashimoto. (1979). *Res. Vet. Sci.*, 27, 218-222.

(参考付表1, 2次頁参照)

(参考付表1) 諸人により報告された牛由来マイコプラズマに対する
各種抗生物質のMIC(平均値)の比較

Species	No. of Strain	TC	CTC	EM	KL	OL	TS	CP	KM
<i>A. laidlawii</i>									
A	1	1.25 $\mu\text{g/ml}$		0.65				0.65	1.25
B	1	5.0	50.0	0.03	5.0	0.25	0.25	5.0	50.0
C	1	0.39	3.13	0.05	3.13	156	3.13	6.25	50.0
D	49	0.78		0.05	1.56		0.10	3.13	1.25
<i>M. bovirhinis</i>									
E(LIQ.)	18	6.25		50.0	12.5	>100.0	1.56	2.50	35.6
D	69	3.13		100.0	6.25		0.39	3.13	6.25
<i>M. bovis genitalium</i>									
C	1	0.20		2.50	1.56		<0.005	1.56	50.0
D	33	0.20		100.0	1.56		0.10	3.13	50.0
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i>									
F(LIQ.)	1	0.25			3.9				7.8
G(LIQ.)	1						0.07		
B	1	0.13	5.0	0.03	0.25	0.25	0.01	1.0	2.5
C	1	0.39	0.39	0.20	3.13	3.13	<0.05	3.13	6.25
C(LIQ.)	1	0.10	0.10	0.20	3.13	1.56	<0.05	3.13	6.25

A: Takahashi et al., B: Ogata et al., C: Kondo et al.,
D: Kishima et al., E: Nagatomo et al.,
F: Tuner et al., G: Hudson.
(LIQ.): liquid medium dilution method

(参考付表2) 諸人により報告されたウレアプラズマに対する
各種抗生物質のFinal MICの比較

	木嶋および橋本	Braunら*	永友および清水
CP	0.20 - >12.5	0.4 - 3.1	12.5 - >100
TP	0.78 - >12.5	○	○
CTC	0.20 - 6.25	○	○
DC	0.025 - 1.56	○	○
OTC	0.20 - 3.13	○	12.5 - 100
TC	0.10 - 3.13	0.4 - 1.6	0.39 - 12.5
EM	0.013 - 0.39	6.2 - 25	1.56 - 6.25
LM	0.05 - >1.56	○	≤0.1 - 3.12
ML	0.013 - >1.56	○	○
OL	0.20 - >1.56	○	12.5 - >100
SP	0.78 - >12.5	○	50
TS	0.10 - >1.56	○	0.78 - 6.25
T-2636C	0.025 - >1.56	○	○
KM	6.25 - >100	3.1 - 25	50 - >100
MTM	0.05 - >0.39	○	○
FMZ	0.003 - >0.10	○	○
FZ	0.20 - >12.5	○	○
TM	0.006 - 0.39	○	○

μg/ml

* 人の泌尿生殖器由来株